

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3430894 A1

21 Aktenzeichen: P 34 30 894.6
22 Anmeldetag: 22. 8. 84
43 Offenlegungstag: 14. 3. 85

51 Int. Cl. 3:
A61K 39/116
A 61 K 39/106
A 61 K 39/108
A 61 K 39/385

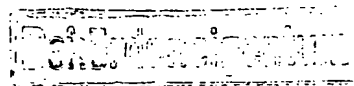
DE 3430894 A1

30 Unionspriorität: 32 33 31
23.08.83 IL 69558

71 Anmelder:
Yeda Research and Development Co., Ltd., Rehovot,
IL

74 Vertreter:
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72 Erfinder:
Sela, Michael; Arnon, Ruth, Rehovot, IL; Jacob,
Chaim O., Petach Tikva, IL



54 ^{Leat}Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles E. coli-Toxin

Es wird ein synthetischer Impfstoff gegen Cholera und Hitze-labiles E.coli-Toxin bereitgestellt, der eine Verbindung eines hochmolekularen Trägers mit einem synthetischen Polypeptid enthält, das in seiner Sequenz einem Teil der Untereinheit B des natürlichen Cholera-Toxins entspricht. Die Sequenzen entsprechen beispielsweise den Aminosäure-Positionen 45 bis 64, 50 bis 64 und 8 bis 20 der Untereinheit B oder diesen ähnlichen, jedoch leicht modifizierten Sequenzen.

VOSSIUS · VOSSIUS · TAUCHNER · HEUNEMANN · RAUH
PATENTANWÄLTE

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 86 · PHONE: (089) 47 40 75
CABLE: BENZOLPATENT MÜNCHEN · TELEX 5-29 453 VOPAT D

3430894

22. August 1984

5 u.Z.: T 229 (Ra/Jae/Ke)
Case: T/546

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED
Rehovot, Israel

10

"Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles
E. coli-Toxin"

15

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles E.
coli-Toxin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
20 daß er ein / Verknüpfungsprodukt aus einem hochmolekularen Träger mit
einem Polypeptid umfaßt, das einem Teil der Sequenz der Un-
tereinheit B des natürlichen Cholera-toxins entspricht.
2. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
25 das Polypeptid synthetischen Ursprungs ist.
3. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeich-
net, daß die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen
30 50 bis 64 der Untereinheit B des Cholera-toxins entspricht.
4. Impfstoff nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Val-Glu-Val-Pro-
Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala aufweist.
- 35 5. Impfstoff nach Anspruch 1 / oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen 8 bis
20 der Untereinheit B des Cholera-toxins entspricht.

- 1 6. Impfstoff nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Leu-Cyc-Ala-Glu-Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-his-Thr-Leu aufweist.
- 5 7. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen 45 bis 64 der Untereinheit B des Choleratoxins entspricht.
- 10 8. Impfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala aufweist.
- 15 9. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der hochmolekulare Träger ein Toxoid ist.
10. Impfstoff nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxoid Tetanus-Toxoid ist.
- 20 11. Impfstoff nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der hochmolekulare Träger ein Polymerisat des Poly AL-Typs mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von mindestens 50000 ist.
- 25 12. Verwendung des Impfstoffs nach Anspruch 1 bis 11, gegebenenfalls zusammen mit einem geeigneten Adjuvants oder Verdünnungsmittel, zur Erzeugung von Immunität gegen Cholera-toxin und Hitze-labiles E. coli-Toxin.

30

35

1

5 Die Erfindung bezieht sich auf Impfstoffe, die dazu geeignet
sind, selektive Immunität gegen Choleratoxin (CT) und Hitze-
labiles E.coli-Toxin (LT von E. coli) zu induzieren. Die
10 Impfstoffe enthalten ein Verknüpfungsprodukt eines hochmole-
kularen Anteils mit einem Polypeptid, das einem be-
stimmten, verhältnismäßig kurzen Teil der Untereinheit B des
natürlichen Toxins entspricht. Beispielsweise werden Poly-
peptide verwendet, die den Aminosäurepositionen 50 bis 64,
8 bis 20 und 45 bis 64 der Untereinheit B des natürlichen
Choleratoxins entsprechen. Der Träger ist ein
15 geeignetes Toxoid, wie das Tetanustoxoid, oder ein synthe-
tisches Polymer mit angemessenem Molekulargewicht, wie
Poly AL (ein Alanin-Lysin-Polymer) mit einem Molékularge-
wicht von mindestens etwa 50 000 und vorzugsweise etwa
100 000. Die Polypeptide sind vorzugsweise synthetischen Ur-
20 sprungs und können mit Hilfe bekannter Methoden der Polypep-
tidsynthese, wie der Festphasen-Synthese nach Merrifield, synthetisiert
werden.

Antiseren gegen die Sequenz der Aminosäuren 50 bis 64 neutra-
lisieren in signifikanter Weise die biologische Aktivität
25 sowohl des Choleratoxins als auch/^{des}Hitze-labilen E. coli-
Toxins.

Geeignete synthetische Peptide, die an passende Träger gebun-
den sind, induzieren Antikörper, die mit Proteinen kreuzrea-
30 gieren können, die solche Peptidsequenzen enthalten. Dies
wurde bereits für das Hühnereiweiß-Lysozym, das
Hüllprotein des Bacteriophagen MS2 sowie das Influenza-
Hämagglutinin/^{gezeigt.} Ähnliche Ergebnisse sind für das Protein M
von Streptococcus pyogenes, das Diphtherietoxin, das Hepati-
35 tis-Virus und das Maul- und Klauenseuche-Virus berichtet
worden. In verschiedenen Fällen konnten die Antikörper die

1 biologische Aktivität von Viren und Toxinen neutralisieren.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, synthetische Peptide bereitzustellen, die Antikörper induzieren können,
5 welche wirksam das Choleratoxin und andere ähnliche Toxine, wie das Hitze-labile E. coli-Toxin neutralisieren. Das Vibrio cholera-Toxin besteht aus/^{den}zwei Untereinheiten A und B. Die Untereinheit A aktiviert die Adenylatcyclase, die die biologische Aktivität steuert, die Untereinheit B dagegen ist
10 verantwortlich für die Bindung an zelluläre Rezeptoren und enthält die meisten immunogenen Determinanten. Antikörper gegen die Untereinheit B können die biologische Aktivität des intakten Toxins neutralisieren. Jedes Monomer der pentameren Untereinheit B (Choleraagenoid) besteht aus einer Kette von
15 103 Aminosäureresten.

Die Erfindung bezieht sich auf die Synthese verschiedener Peptide der Untereinheit B des Choleratoxins und auf Antikörper, die sowohl das intakte Choleratoxin, als auch andere
20 Toxine, wie das Hitze-labile E.coli Toxin, neutralisieren.

Es werden synthetische Impfstoffe gegen Choleratoxine und Hitze-labile E. coli-Toxin bereitgestellt. Diese enthalten ein geeignetes Polypeptid, das einem bestimmten Bereich der
25 Untereinheit B des Choleratoxins entspricht und an einen geeigneten polymeren hochmolekularen Träger, wie geeignete Toxoide (Tetanustoxoid oder ähnliche) oder geeignete Polymere, wie Poly AL mit einem Molekulargewicht von mindestens etwa 50 000 und vorzugsweise etwa 100 000 bis
30 120 000,^{gebunden ist.} Geeignete synthetische Polypeptide entsprechen entweder den Aminosäurepositionen 50 bis 64, 45 bis 64 oder 8 bis 20 der Untereinheit B des Choleratoxins. Die Aminosäuren 50 bis 64 der Untereinheit B des Choleratoxins entsprechen der Sequenz Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala, die Aminosäuren 8 bis 20 der Sequenz
35 Leu-Cys-Ala-Glu-Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-His-Thr-Leu und

- 1 die Aminosäuren 45 bis 64 der Sequenz Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-
Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala.
In der Sequenz der Aminosäurepositionen 50 bis 64 ist es
möglich, das aminoterminal Val durch beliebige andere Amino-
5 säuren zu ersetzen. Anstelle des carboxyterminalen Ala kann
Cys inseriert werden. Auf diese Art und Weise modifizierte
Polypeptide haben eine ähnliche oder sogar eine bessere Ak-
tivität.
- 10 In die Sequenz der Aminosäurepositionen 8 bis 20 kann anstel-
le von Cys die Aminosäure Ala eingesetzt werden. Die erhalte-
ne Aktivität ist ähnlich. Dies wurde durch Experimente er-
mittelt.
- 15 Es ist klar, daß auch leichte Modifikationen in Bezug auf
Kettenlänge und Zusammensetzung der vorstehend definierten
Sequenzen verwendet werden können, ohne von der Erfindung
abzuweichen.
- 20 Um die Antikörperbildung zu induzieren, muß das Polypeptid
an einen geeigneten Träger mit geeignetem Molekulargewicht
gebunden sein. Das Tetanustoxoid hat sich als geeigneter
Träger erwiesen. Ebenso kann jedes geeignete Polymer verwen-
det werden, vorzugsweise besteht dies aus Aminosäuren wie
25 Poly AL (ein Alanin-Lysin-Copolymer) mit einem durchschnitt-
lichen Molekulargewicht von etwa 100 000 bis 120 000. An-
scheinend wird ein Molekulargewicht von mindestens 50 000
benötigt.
- 30 Es wurde gefunden, daß die synthetischen Impfstoffe auch
gegen Hitze-labiles Toxin von E. coli (LT von E. coli) wirk-
sam sind. Antikörper gegen die beiden Peptide neutralisieren
sowohl die Aktivität des LT von E. coli als auch die des
Choleratoxins (CT). Das dritte Polypeptid, mit der Sequenz
35 der Aminosäurepositionen 45 bis 64 hat eine leicht bessere
Wirksamkeit als das mit der Sequenz der Aminosäurepositionen

- 1 50 bis 64. Durch Radioimmunoassay und den Immuno-Blotting-Test wurde die Kreuzreaktivität von anti-(8-20-Polypeptid) / ^{-Antikörpern} und anti-(50-64-Polypeptid) / ^{-Antikörpern} mit dem LT von E. coli nachgewiesen. Die Neutralisierung des LT-E. coli verhindert die
- 5 Induktion der Adenylatcyclase-Aktivität durch das Toxin, die Flüssigkeitsezernierung in abgebundenen Ileumschleifen des Rattendarms und die Induktion der Adenylatcyclase-Aktivität durch Choleratoxin.
- 10 Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung.

B e i s p i e l

15 Choleratoxin wurde gekauft. Die Trennung der Untereinheiten und die Isolation der Untereinheit B wurde durch Gelfiltration durch Sephadex G-75 nach der Methode von C.Y. Lai ("CRC Critical Reviews" Bioch 9, S. 171 - 207 (1980)) in 5prozentiger Ameisensäure durchgeführt. / ^{Die} t-Butyloxycarbonyl-(t-boc)-Derivate der verschiedenen Aminosäuren wurden ebenfalls gekauft. Alle anderen Reagenzien weisen die für analytische Zwecke erforderliche oder die beste verfügbare Reinheit auf.

Peptidsynthese:

25 Die Peptide wurden nach der Festphasen-Methode von B.B. Merrifield (Sci. 150, Seiten 178 bis 185 (1965)) synthetisiert. Dabei wurden folgende Seitenketten-Schutzgruppen der t-boc-Derivate verwendet: Benzyläther für die Hydroxylgruppen von Serin und Threonin, Dichlorbenzyläther für die phenolische

30 Hydroxylgruppe des Tyrosins, und Carbobenzoxy-Gruppen für die ϵ -Aminogruppe von Lysin. Die α -Carboxyl-Gruppe von Asparagin und Glutamin wurde durch Veresterung mit p-Nitrophenol geschützt. Die Nitroguanidino-Gruppe von Arginin und die Imidazol-Gruppe von Histidin wurden durch Tosyl-Gruppen geschützt. Das Ausgangs-Aminosäure-Harz wurde durch Veresterung der entsprechenden t-boc-Aminosäure mit dem Chlor-methylierten Harz

35

1 (Polystyrol - 1 % Divinylbenzol) hergestellt.

Das Fortschreiten der Synthesereaktion wurde durch Ninhydrin-Analyse überwacht. Wenn sich aus Ninhydrin-Test und Aminosäure-Analyse ergab, daß die Kopplungsreaktion zu weniger
5 als 99 % abgelaufen war, wurden zwei Kopplungsreaktionszyklen durchgeführt. Bei der Synthese von CTP 6 wurden zur Verhinderung der Oxidation von Tryptophan 5 % (v/v) 1,2-Äthandithiol zur Trichloressigsäure zugegeben. Die Schutzgruppen
10 wurden entfernt und die Peptide wurden vom Harz bei 0°C durch Behandlung mit wasserfreiem HF (Fluor-Wasserstoff), der 10 % Anisol und 1 % 1,2-Äthandithiol als Spülmittel enthielt, abgetrennt.

15 Die nach dem Abtrennen vom Harz wiedergewonnenen Rohpeptide wurden mit Sephadex G-25 Säulen gereinigt. Die Reinheit der Peptide wurde durch Aminosäure-Analyse, Gegenstromhochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) und/oder Hochspannungspapierelektrophorese geprüft.

20

Verknüpfung der Peptide mit Tetanus-Toxoid

Zwei Verknüpfungsmethoden wurden angewendet:

25 I) 1-Äthyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid als Kopplungsagens (nach Müller et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 79, Seiten 569 bis 573 (1982)).

II) Während es sich noch am Harz befand, wurde das Peptid
30 vor der HF-Spaltung durch t-boc-p-Aminophenyllessigsäure (PAPA) verlängert. Die PAPA-Peptide wurden in kalter 2 N Salzsäure gelöst, durch Zugabe von eiskalter wäßriger Natriumnitritlösung (0,1 molar) diazotiert und zu einer Lösung von Tetanustoxoid in NaHCO_3 (0,5 molar) zugegeben. Da-
35 bei wurde der pH-Wert durch Zugabe von konzentriertem Na_2CO_3 auf 8,5 gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde nach 10 Stun-

- 1 den bei 4°C gegen 10 mM Ammoniumcarbonat dialysiert und gefriergetrocknet. Der Peptidgehalt der Verknüpfungsprodukte, wurde, sofern möglich, durch Aminosäureanalyse und Markierung mit ^{125}J bestimmt.

5

Immunisierungsverfahren

- Kaninchen wurden, wie von Müller et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, Seiten 569 - 573 (1982)) beschrieben, durch an mehreren Stellen verabreichte intradermale Injektionen von 1 mg des Verknüpfungsprodukts, gelöst in 0,5 ml Pi/NaCl und emulgiert in 0,5 ml vollständigem Freund's Adjuvans, sowie mit verschiedenen Verstärkern versehen, immunisiert.

Festphasen-Radioimmunoassay (RIA)

- 15 Dieser wurde auf Antigen-beschichteten (0,5 bis 1,0 µg/Bohrung), biegsamen V-Boden-Mikrotiter-Platten durchgeführt (vorbeschichtet mit Glutaraldehyd (0,2 %) sofern Peptide als Antigen verwendet wurden). Zunächst wurde eine Dreifachverdünnungsreihe des zu testenden Serums und anschließend mit Bolton und Hunter-Reagens (10^5 cpm/50 µl/Bohrung) mit ^{125}J markiertes Protein A zugegeben. Die gewaschenen und getrockneten Bohrungen der Mikrotiterplatten wurden ausgeschnitten und in einem γ-Zähler gezählt.

- 25 Bei kompetitiven Inhibitionstests wurden die Antigen-beschichteten Bohrungen mit 10-fach Verdünnungsreihen einer Lösung des zu testenden Inhibitor-Peptids in Pi/NaCl (0,1 % BSA) inkubiert, bevor jeweils die gleiche Verdünnungsstufe eines Antipeptid-Serums zugesetzt wurde.

30

Enzyme Labelled Immunosorbent Assay (ELISA)

- Dieser wurde ähnlich dem RIA durchgeführt, jedoch wurden Platten mit flachem Boden und eine Verbindung des Protein A mit β-Galactosidase (Amersham) anstatt der radioaktiven Markierung verwendet. Nach Zugabe des Substrats (O-Nitrophenyl-β-galactopyranosid) wurden die Platten maschinell ausgewertet.

2. Oktober 1984

- 9 -

3430894

1 Immunpräzipitation

Nach der Chloramin-T-Methode wurde Cholera-Toxin mit ^{125}J markiert (Heitmancik et al., Infect. Immun. 17, Seiten 621-628, (1977)). Die Immunpräzipitation wurde im wesentlichen nach S.W. Kessler durchgeführt (J. Immunol. 115, Seiten 1617 bis 1624 (1975)). Das ^{125}J -markierte Cholera-Toxin wurde an intakte Staphylococcus A präadsorbiert und anschließend mit verschiedenen Antiseren umgesetzt. Durch Zugabe gleicher Mengen Staphylococcus A wurden Präzipitate erhalten, die durch Gelelektrophorese auf SDS-Polyacrylamid-Gelen und anschließender Autoradiographie analysiert wurden.

Elektrophorese-Blotting-Verfahren

Auf einem 5 - 15-prozentigen SDS-Polyacrylamid-Gel in seine Untereinheiten getrenntes Cholera-Toxin wurde auf Nitrocellulose-Papier nach der Methode von Towbin et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, Seiten 4350 bis 4354 (1979)) übertragen. Der so hergestellte Blot wurde zur Verringerung der unspezifischen Antiserum-Bindung 1 Stunde mit 9 mM Tris HCl-Puffer, 0,9 molar NaCl, 3 % w/v BSA, pH 7,4, inkubiert, und anschließend in Streifen zerschnitten. Diese Streifen wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 1:50 Verdünnungen verschiedener Antiseren inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurden die Streifen 2 Stunden mit ^{125}I -markiertem Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (5×10^5 cpm/ml) inkubiert. Von den gewaschenen und getrockneten Blots wurden Autoradiogramme hergestellt.

Toxin-Neutralisierungs-Aktivität

30 I. Gefäß-Permeabilitäts-Test

Der Test wurde im wesentlichen nach J.P. Craid (J. Bacteriol. 92, Seite 795 (1966)) und C.Y. Lai (CRC Critical Reviews in Biochem. 9, Seiten 171 bis 207 (1980)) durchgeführt: Verdünnungsreihen der zu testenden Antiseren wurden mit einer konstanten Menge Cholera-Toxin vermischt, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 0,1 ml der Reaktionsgemische wur-

1 den erwachsenen Kaninchen an drei rasierten Hautstellen intra-
kutan injiziert. Nach 18 Stunden wurden den Kaninchen 1 ml/kg
5 % Evans -Blau intravenös injiziert und der Durchmesser der
sich ergebenden blauen Verhärtung wurde 1 Stunde später ge-
5 messen. Als Neutralisationsendpunkt wurde die höchste Serum-
Verdünnung angesehen, die das Auftreten blauer Verhärtungen
verhindert. Bei jedem Kaninchen wurde sowohl eine positive
(kein Antiserum) als auch eine negative (kein Cholera-Toxin)
Kontrolle durchgeführt.

10

II. Test mit abgebundenen Ileum-Schleifen

Der Test wurde im wesentlichen wie von Fujita und Finkelstein
(J.Infect. Dis. 125, Seiten 647 bis 655 (1972)) beschrieben,
durchgeführt. Dazu wurden Ratten oder erwachsene Kaninchen,
15 die 12 Stunden lang gehungert hatten mit Äther anästhe-
siert, das Abdomen geöffnet und der Dünndarm wurde in 3 bis
4 cm lange Schleifen gebunden, wobei 10 cm vom Zwölffinger-
darm entfernt begonnen wurde. In die Schleifen wurden ver-
schiedene Verdünnungen der zu testenden Seren injiziert und
20 das Abdomen wieder verschlossen. Die Seren waren vorher mit
einer konstanten Menge Cholera-Toxin inkubiert worden.
Nach 5 Stunden ohne Futter und Wasser wurden die Tiere ge-
schlachtet. Durch Bestimmung der Länge und des Gewichts jeder
Darmschleife wurde die Flüssigkeitsansammlung pro cm der
25 Schleife bestimmt. Bei jedem Tier wurden sowohl positive
(kein Antiserum) als/^{auch}negative (kein Cholera-Toxin) Kontrollen
durchgeführt.

Spaltung der Untereinheit B

30 Zur Festlegung der Bereiche, die an der Antigenreaktion teil-
nehmen, wurde die Untereinheit B mit CNBr in drei Fragmente
zerlegt: Aminosäuren 1 bis 37 und 69 bis 101, durch Disulfid-
Brücken zwischen den Cystein-Resten an Position 9 und 86 ver-
bunden; Aminosäuren 36 bis 68 und Aminosäuren 102 bis 103.
35 Die Fragmente wurden auf Sephadex G-50 Säulen getrennt und
die beiden größeren Peptide wurden auf ihre Reaktivität mit

- 1 Antiseren gegen Cholera-Toxin getestet. Das größte Peptid war teilweise kreuzreaktiv mit dem anti-Cholera-Toxin-Serum, wogegen das Peptid mit den Aminosäuren 38 bis 68 anti-Toxinhomologe anti-Seren inhibierte, obwohl es nicht direkt an diese anti-Seren binden konnte (nicht gezeigte Ergebnisse).

Auswahl von Peptiden für die Synthese

- Die Auswahl von Peptiden zur Chemo-Synthese wurde durch die vorstehend beschriebenen Ergebnisse mit den CNBr-Fragmenten der Untereinheit B bestimmt. Es wurde das Peptid mit den Aminosäuren 30 bis 42 (CTP 2) synthetisiert, da angenommen wurde, daß Arg 35 oder die umgebende Region an der Antikörper- und Rezeptor-Bindungs-Aktivität beteiligt ist (Duffy et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 91, Seiten 1005 - 1010 (1979)). Das Peptid mit den Aminosäuren 83 - 97 (CTP 6), das Trp 88 enthält, wurde synthetisiert, weil die chemische Modifikation dieses Restes die Bindung vom GM1 an Cholera-Toxin verhindert hatte (De Wolf et al., J. Biol. Chem. Bd. 256 Seite 5481 - 5488 (1981)). Außerdem wurde das Peptid mit der höchsten Durchschnitts-Hydrophilizität (Aminosäurereste 79-84) synthetisiert, weil von solchen Sequenzen angenommen wird, daß sie in oder direkt benachbart zu antigenen Determinanten liegen (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, Seiten 3824 - 3828 (1981)). Da von Arnon et al. (Biochem. J. 75, Seiten 103-109 (1960)) die Antigenität von Tyrosin-Resten beschrieben worden war, wurden auch die Peptide, die die Tyrosinreste an Position 12 und Position 76^{enthalten}/hergestellt, nämlich CTP 1 (Aminosäurereste 8 - 20) und CTP 5 (Aminosäurereste 75 - 85). Weil das letztere der Peptide nur 11 Aminosäurereste enthielt, wurde ein zusätzliches Peptid (CTP 4 genannt) mit einer längeren Sequenz hergestellt (Aminosäurereste 69 bis 85). Das Peptid mit den Aminosäuren 50 - 64 (CTP 3) wurde synthetisiert, weil es ein Teil des inhibierenden CNBr-Fragments mit den Aminosäuren 38 bis 68 ist.

1 Synthese und Verknüpfung von Peptiden

Die synthetisierten Peptide gehören zu verschiedenen Bereichen der Untereinheit B des Cholera-Toxins (Figur 1). Die einzige Abweichung von der natürlichen Sequenz ist der Austausch von Cystein-Resten an Aminosäureposition 9 und 86 (in CTP 1 und 6) durch Alanin-Reste, um die Bildung von Aggregaten zu verhindern. Die Ergebnisse der Aminosäure-Analysen der Peptide stimmen recht gut mit den erwarteten Werten für die verschiedenen Aminosäure-Reste überein. Die Reinheit der Peptide wurde weiter durch Gegenstrom-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und/oder Hochspannungs-Papierelektrophorese festgestellt. Das Endprodukt enthielt weniger als 5 % Verunreinigungen. Die gereinigten Peptide wurden an Tetanus-Toxoid entweder mit einem wasserlöslichen Carbodiimid als Verknüpfungs-Reagens oder durch eine Azobindung, falls PAPA-Derivate der Peptide verwendet wurden / Der Vorteil der Bindung über PAPA-Reste ist die Spezifität der Verknüpfung, die nur zwischen den aminoterminalen Aminogruppen des PAPA und den Histidin- oder Tyrosin-Resten des Trägers vorkommt (Spirer et al., Eur. J. Immunol. 7, Seite 69 - 74 (1977)). Durch beide Verknüpfungsmethoden werden gleichwertige Produkte erhalten (Tabelle I).

25 Immunologische Reaktivität.

Die Verknüpfungsprodukte aller sechs Peptide mit Tetanus-Toxoid induzierten Antikörper, die auch auf die entsprechenden homologen Peptide spezifisch reagieren (Figur 2). Die stärkste Immunantwort wurde bei CTP 1 und CTP 6 beobachtet (Figur 2). Vier der Antiseren waren außerdem in verschiedenem Ausmaß gegenüber der vollständigen Untereinheit B und dem vollständigen nativen Cholera-Toxin kreuzreaktiv. Diese Kreuzreaktivität wurde durch drei Tests nachgewiesen: Festphasen-radioimmunoassay (Figur 2), Immuno-Blotting-Technik (Figur 3) und Immunpräzipitation (Tabelle II). Alle drei Methoden ergaben ähnliche Resultate.

- 1 Das Peptid CTP 3 induzierte Antikörper, die eine starke Kreuzreaktivität mit dem intakten Toxin zeigten. Diese war in ihrem Ausmaß vergleichbar mit der anti-Peptid-Reaktion auf homologe Peptide (Figur 2). Sowohl die anti-Peptid-Reaktion auf homologe Peptide als auch die Kreuzreaktivität sind natürlich spezifisch, denn sie können vollständig durch Zugabe eines Überschusses freien CTP 3 Peptids inhibiert werden (Figur 4). Außerdem ist CTP 3 das einzige der untersuchten Peptide, das mit Antiserum gegen intaktes natives Cholera-Toxin (Figur 5) reagierte. Daraus folgt, daß die Kreuzreaktivität mit einem nativen Protein nicht typisch für jedes der aus ihm abgeleiteten Segmente ist.

15 Dies wird weiter durch einen Vergleich der verwandten Peptide CTP 4 (Aminosäureposition 69 - 85) und CTP 5 (Aminosäureposition 75 - 85) ^{bestätigt.} Obwohl ein Antiserum gegen CTP 5 einen hohen Titer gegenüber dem homologen Peptid hatte, kreuzreagierte es weder mit der Untereinheit B noch mit dem Gesamt-Toxin. Die Verlängerung dieses Peptids um sechs Aminosäurereste ergab CTP 4, das Antikörper hervorrief, die mit den intakten Proteinen kreuzreagierten, obwohl die homologen anti-Peptid-Titer nicht deutlich höher waren als im Falle von CTP 5.

- 25 Die Ergebnisse der Immunpräzipitations-Experimente (Tabelle II) erläutern die quantitative Seite der Kreuzreaktivität zwischen den anti-Peptid-Antikörpern und dem Cholera-Toxin. Die anti-Peptid CTP 3-Antikörper zeigen tatsächlich die höchste Kreuzreaktivität. Diese beträgt ungefähr 30 % der homologen Toxin-anti-Toxin-Reaktion. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem RIA sind anti-CTP 1- und -CTP 6-Antikörper signifikant kreuzreaktiv mit dem intakten Toxin, wogegen die restlichen Peptide nur geringe Reaktivität zeigen. Das Amino-Blott-Experiment bestätigt diese Ergebnisse und gibt einen zusätzlichen interessanten Hinweis. Weil in diesem Fall das intakte Cholera-Toxin durch Elektro-

- 1 phorese vor der Wechselwirkung mit den verschiedenen Antiseren
in seine beiden Untereinheiten zerlegt wurde, ist aus den Er-
gebnissen klar, daß ein Antiserum gegen CTP 1 nicht nur mit
der Untereinheit B, sondern auch in einem bemerkenswerten
5 Ausmaß mit der Untereinheit A des Cholera-Toxins reagiert.

Inhibition der Adenylat-Cyclase-Aktivität

- Weil die Diarrhoe als Reaktion auf CT oder LT ein Ergebnis
der Aktivierung der Adenylat-Cyclase in der Zellmembran der
10 Epithel-Zellen des Dünndarms ist, wurde bestimmt, inwieweit
die verschiedenen Antisera CT-induzierte oder LT-induzierte
Adenylat-Cyclase-Aktivität inhibieren. Die Enzymaktivität wur-
de durch Bestimmung des Ausmaßes der cAMP-Produktion in dis-
pergierten Hühner-Nieren-Zellen ermittelt. Wie in Tabelle V
15 gezeigt, inhibieren Antiseren gegen CTP 1 und CTP 3 spezi-
fisch die CT-induzierte Adenylat-Cyclase-Aktivität bis zu
etwa 60 bis 65 %. Dasselbe gilt für die LT-induzierte Adeny-
lat-Cyclase-Aktivität, denn anti-CTP1- und anti-CTP3-Anti-
körper inhibieren diese Aktivität spezifisch in einem ähn-
20 lichen Ausmaß.

Neutralisation der biologischen Aktivität

- Die Fähigkeit biologische Effekte des Cholera-Toxins zu neu-
tralisieren wurde für die Seren gegen die verschiedenen
25 Peptide ermittelt. Dazu wurden zwei in vivo-Tests der Cholera-
Toxin-Aktivität angewendet, nämlich ein Hauttest, bei dem
die verstärkte Gefäßpermeabilität, die durch das Toxin her-
vorgerufen wird, gemessen wird, und außerdem ein Test, bei
dem die Flüssigkeitsansammlung, die vom Cholera-Toxin in ab-
30 gebundenen Dünndarmschleifen erwachsener Kaninchen induziert
wird, gemessen wird. Die Ergebnisse dieser beiden Experimen-
te werden in den Tabellen III und IV gezeigt. In beiden Fäl-
len verursachten anti-CTP 3-Antikörper eine teilweise Inhibi-
tion der Toxin-Aktivität. Obwohl das anti-CTP 3-Antiserum
35 weniger wirksam gegen natives Cholera-Toxin war als gegen
dieses gerichtetes Antiserum, verhinderte es doch bis zu 40 %

1 der Flüssigkeitsansammlung im Kaninchendarm. Obwohl diese bei-
den Tests in vivo durchgeführt worden sind, beweisen sie le-
diglich die Gegenwart von Antikörpern in den Seren der immuni-
sierten Kaninchen. Das Peptid CTP 3,/^{dessen Antikörper} die stärkste immuno-
5 logische Kreuzreaktion mit Cholera-Toxin zeigten, hat eine
bemerkenswerte Fähigkeit, Antikörper zu induzieren, die die
biologische Aktivität des Cholera-Toxins neutralisieren. Es
kann für die Induktion eines immunologischen Schutzes gegen-
über diesem Toxin verwendet werden.

10

Die vorstehend beschriebenen Versuche zeigen, daß die erfin-
dungsgemäß hergestellten synthetischen Impfstoffe für die
Impfung gegen Cholera-Toxin verwendet werden können. Die zur
Impfung von Menschen erforderliche Menge des am Träger gebun-
15 den Polypeptids beträgt etwa 2 bis 20 mg. Es ist klar, daß
das Verknüpfungsprodukt in einem geeigneten Trägermaterial
mit geeignetem Adjuvans angewendet werden muß.

20

25

30

35

1

Tabelle I

Eigenschaften verschiedener Verbindungen von Peptiden mit Tetanus-Toxoid
(MW 150 000)

5

Peptid	Position	Verknüpfungs- Methode	Peptid/Träger-Verhältnis	
			zur Verknüpfung verwendet (mol/mol)	im Verknüpfungs- produkt (mol/mol)
BP ₁	8-20	PAPA*	95	54
..		EDCI**	40	27
BP ₂	30-42	EDCI	45	11
BP ₃	50-64	PAPA	94	63
		EDCI	41	14
BP ₄	69-85	EDCI	40	19
BP ₅	75-85	EDCI	35	10
BP ₆	83-97	PAPA	75	25
		EDCI	49	24

20

* PAPA = p-Aminophenyllessigsäure, die an das Peptid über eine Amid-Bindung gebunden ist und nach der Diazotierung mit dem Protein verbunden wird

** EDCI = 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid

25

Tabelle II

Immunpräzipitation von ¹²⁵J-Cholera-Toxin durch verschiedene Antipeptidseren

Serum	gefälltes ¹²⁵ J-Cholera-Toxin	
	cpm	% der Gesamt-Radioaktivität
30	anti-CTP1	41880
	anti-CTP2	9119
	anti-CTP3	66498
	anti-CTP4	4956
	anti-CTP5	2980
35	anti-CTP6	47813
	anti-Cholera-Toxin	221560
	Präimmun-Serum	2694

1

Tabelle III

Inhibition Cholera-Toxin induzierter Gefäß-Permeabilität in der
Kaninchenhaut durch anti-CTP 3-Peptid-Antikörper

5

Immunitätstest (ng Toxin)	Gefäß-Permeabilitäts-Reaktion		
	anti-Cholera-Toxin ^b	anti-CTP 3 ^b	Präimmun-Serum ^b
0,5	-	-	+++
1,0	-	+	+++
2,0	-	+++	+++
3,0	-	+++	+++

10

- a
- +++ starke blaue Verhärtung
 - + schwache blaue Verhärtung
 - keine Blaufärbung

15

- b
- Alle Seren wurden in der Verdünnung 1 : 10 eingesetzt

20

25

30

35

Tabelle IV

Neutralisation von Cholera-Toxin durch Antiseren gegen das Peptid CTP 3
(Aminosäureposition 50 - 64)

	Cholera-Toxin (µg)	Serum	Verdünnung	Gewicht/cm Schleife	Reduzierte Sekretion (%)
5	0,0	keins (Kochsalzlösung)		0,20	
	1,5	keins (Kochsalzlösung)		1,30	
10	1,5	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,45	
	1,5	anti-CTP 3	1:2	1,02	40
	1,5	normales Kaninchen-Serum	1:2	1,25	
	3,0	keins (Kochsalzlösung)		1,36	
15	3,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,51	
	3,0	anti-CTP 3	1:2	1,08	33
	5,0	keins (Kochsalzlösung)		1,42	
	5,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,58	
	5,0	anti-CTP 3	1:2	1,32	12
20	7,5	keins (Kochsalzlösung)		1,42	
	7,5	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,60	
	7,5	anti-CTP 3	1:2	1,32	12
	10,0	keins (Kochsalzlösung)		1,50	
25	10,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,69	
	10,0	anti-CTP 3	1:2	1,50	0

a) Voraussgesetzt, daß die Reduktion, die durch das Antiserum gegen Cholera-Toxin hervorgerufen wird, 100 % ist.

1

Tabelle v

Spezifität der cAMP Inhibition durch Antiseren

5

cyclisches AMP induziert durch:

10

Antiserum zugegeben	Cholera-Toxin			Parathyroid-Hormone		Isoproterenol	
	pmol / 250000 Zellen %		Signi- fikanz (p) ^a	pmol / 250000 Zellen	%	pmol / 250000 Zellen	%
keins	5,9 ^b	100		3,7	100	4,8	100
NRS	5,6	95	n.s. ^c	3,5	94	4,6	95
CT	0,5	8	0,001	3,8	100	4,6	95
15 CTP1	3,2	54	0,01	3,7	100	4,7	98
CTP3	2,5	42	0,01	3,5	94	4,6	95
TT	5,6	95	n.s.	n.t. ^d		n.t.	

20

a Signifikanz der Differenz zwischen Cholera-Toxin-induziertem cAMP ohne Antiserum und mit einem der angewendeten Antiseren

b Werte entsprechen dem Mittel aus drei Versuchen

25

c n.s.- nicht signifikant

d n.t.-nicht getestet.

30

35

1 Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenz der Untereinheit B des Cholera-Toxins;

5

Figur 2 veranschaulicht die Antikörper-Antwort von Kaninchen auf verschiedene Peptide der Untereinheit B des Cholera-Toxins;

10 Figur 3 erläutert die Kreuzreaktivität verschiedener Peptide, die durch die Immuno-Blott-Methode ermittelt wurde;

15 Figur 4 erläutert die Kreuzreaktivität der Peptide und die Inhibition durch eines der synthetischen Peptide;

Figur 5 erläutert die Reaktivität des Peptids mit den Aminosäuren 50 - 64 mit Antiserum gegen Cholera-Toxin.

20

Reaktionen mit: ■ - homologen Peptiden;
▲ - der Untereinheit B des Cholera-Toxins;
und 0 - Cholera-Toxin.

25 Bei allen Peptiden mit Ausnahme von CTP 3 ist der Unterschied in den Maßstäben für ^{die} Reaktionen zwischen dem Peptid und den intakten Proteinen zu beachten.

30

35

23
21

Nummer: 34 30 894
Int. Cl.³: A 61 K 39/116
Anmeldetag: 22. August 1984
Offenlegungstag: 14. März 1985

Primär-Struktur der Untereinheit B

Thr - Pro - Gln - Asn - Ile - Thr - Asp - ¹⁰Leu - Cys - Ala - Glu - Tyr - His - Asn -
Thr - Gln - Ile - His - Thr - ²⁰Leu - Asn - Asn - Lys - Ile - Phe - Ser - Tyr - Thr -
Glu - ³⁰Ser - Leu - Ala - Gly - Lys - Arg - Glu - Met - Ala - [Ile - ⁴⁰Ile - Thr - Phe -
Lys - Asn - Gly - Ala - Thr - Phe - Glu - ⁵⁰Val - Glu - Val - Pro - Gly - Ser - Gln -
His - Ile - Asp - ⁶⁰Ser - Gln - Lys - Lys - Ala - [Ile - Glu - Arg - Met - Lys - ⁷⁰Asn -
Thr - Leu - Arg - Ile - Ala - Tyr - Leu - Thr - Glu - ⁸⁰Ala - Lys - Val - Glu - Lys -
⁹⁰Leu - Cys - Val - Trp - Asn - Asn - Lys - Thr - Pro - His - Ala - Ile - Ala - Ala -
¹⁰⁰Ile - Ser - Met - Ala - ¹⁰³Asn

Fig. 1

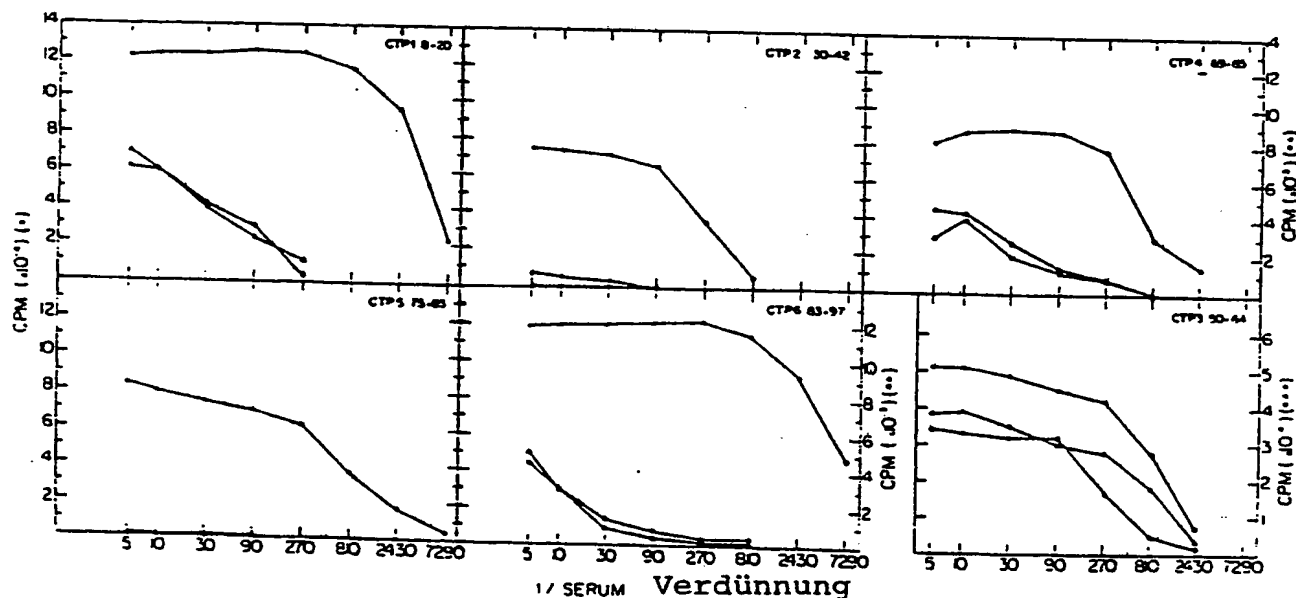


Fig. 2

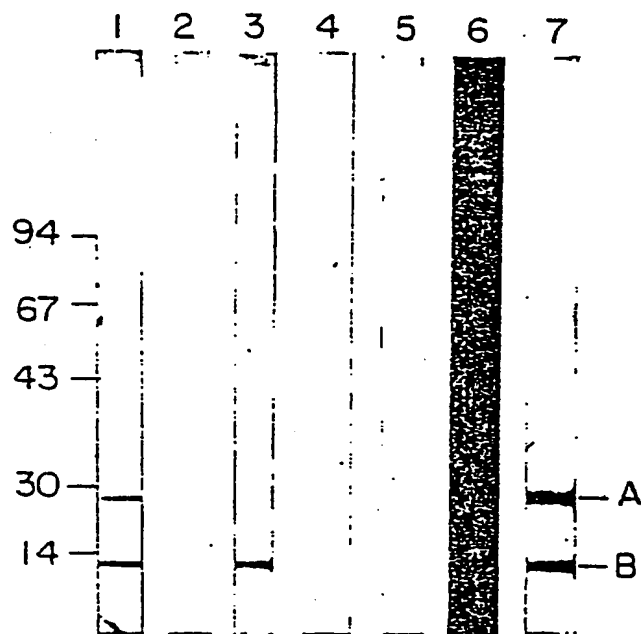


Fig. 3

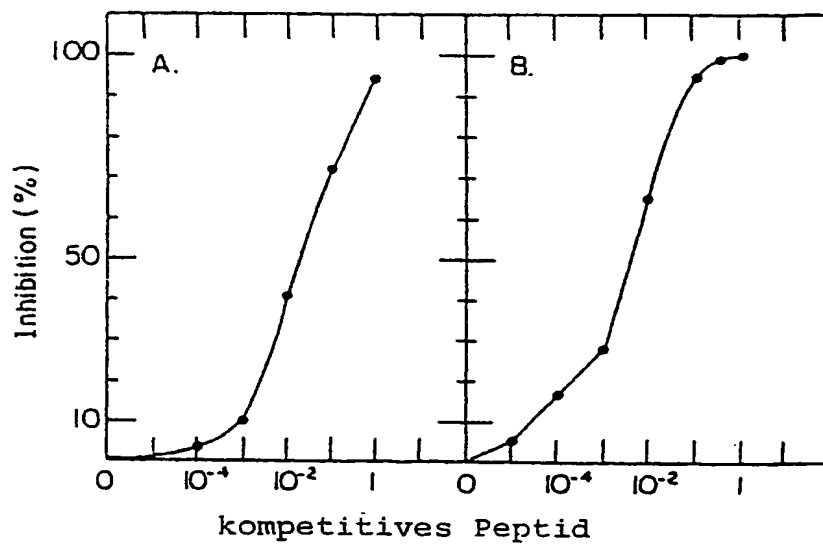


Fig. 4

~~23~~
22

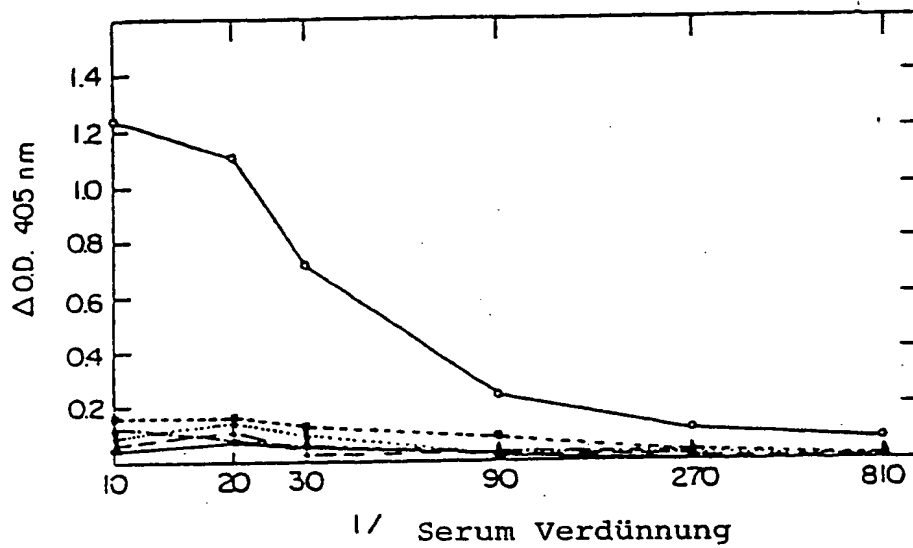


Fig. 5